PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/07239
C12Q 1/68	A1	(43) Internationales
	<u> </u>	Veröffentlichungsdatum: 27. Februar 1997 (27.02.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP	96/035	(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
(22) Internationales Anmeldedatum: 14. August 1996 (	14.08.9	
(30) Prioritätsdaten: 195 30 132.3 16. August 1995 (16.08.95)	I	Veröffentlicht  DE Mit internationalem Recherchenbericht.
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US) PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUN WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN [DE/DE]; H strasse 2, D-80539 München (DE).	NG DE	er
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Oliver Harnackstrasse 61, D-44139 Dortmund (DE). I Rainer [DE/DE]; Am Westheck 36, D-44309 I (DE).	DEUTE	ir,
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstras 81679 München (DE).	sse 9, 1	D-
<u> </u>		
(54) Title: PROCESS FOR PURIFYING, STABILISING	OR IS	SOLATING NUCLEIC ACIDS FROM BIOLOGICAL MATERIALS
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REINIGUNG, BIOLOGISCHEN MATERIALIEN	STABI	ILISIERUNG ODER ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN AUS
(57) Abstract		
		and/or isolating nucleic acids from biological materials, said process being (e.g. potato flour) is added to a sample of biological materials containing
(57) Zusammenfassung		•
	enthalte	erung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, enden Probe aus biologischen Materialien eine Adsorptionsmatrix auf einigungen zusetzt.
*		,

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AΤ	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbedos	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BR	Belgien	. HU	Ungam	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Paso	IB	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Dalien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Ruminien
BR	Brasilien	KB	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	ü	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
—CM—	- Kamerun -	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	
DK	Dånemark	MD	Republik Moldau	UA	Trinidad und Tobago Ukraine
. BE	Estland	MG	Madagaskar	UG	
ES	Spanien	ML	Mali	US	Uganda
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Vereinigte Staaten von Amerika
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Usbekistan
GA	Gabon	MW	Malawi	AM	Vietnam
		174 77	MAMILY I		•

- 1 -

V rfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien

#### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung, Reinigung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien durch Entfernung von Verunreinigungen, z.B. von Nukleinsäuren schädigenden und enzymatische Reaktionen hemmenden Substanzen. Dieses Verfahren ist insbesondere zur Analyse, zum Nachweis oder zur Isolierung von Nukleinsäuren in Stuhlproben geeignet. Weiterhin wird ein für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignetes Reagenzienkit offenbart.

Zahlreiche Beispiele aus verschiedenen Forschungsbereichen belegen die Bedeutung der Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, die mit Substanzen verunreinigt sind, welche Nukleinsäuren während der Lagerung schädigen und eine enzymatische Manipulation der Nukleinsäuren, z.B. durch Amplifikation hemmen. Daher ist es für die Brauchbarkeit der in den biologischen Materialien enthaltenen Nukleinsäuren für weitere Analysen wichtig, daß diese Substanzen nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden sind oder gänzlich aus der Probe entfernt werden.

Eine besondere Bedeutung besitzt die Analyse von Nukleinsäuren aus fäkalen Proben. Die medizinische Hauptanwendung ist der Nachweis tumorspezifischer Veränderungen von nukleärer DNA aus Stuhl, die als Parameter bei der Frühdiagnose von Tumoren des Verdauungstrakts dienen können. Ebenso gewinnt der Nachweis bakterieller und viraler Infektionserreger aus Stuhlprobendurch auf Nukleinsäuren basierende Testverfahren zunehmend an Bedeutung.

- 2 -

Eine Methode zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Stuhl wird in WO 93/20235 offenbart. Diese Methode ergibt jedoch nur geringe Ausbeuten an Nukleinsäuren. Weiterhin werden DNA-schädigende oder/und PCR-hemmende Substanzen nicht abgetrennt. Daher kann die isolierte DNA nicht über längere Zeit gelagert werden und eine Amplifikation zur Vermehrung spezifischer, zu analysierender Genabschnitte dieser DNA liefert keine reproduzierbaren Ergebnisse. Ein besonders schwerwiegender Nachteil des bekannten Verfahrens besteht darin, daß bei der PCR-Amplifikation keine intakten DNA-Fragmente mit einheitlicher Sequenz entstehen, die für eine weitere Analyse notwendig sind. Um diese zu erhalten, ist eine aufwendige Klonierung der amplifizierten Genabschnitte notwendig. Noch ein weiterer Nachteil Verfahrens des Standes der Technik besteht darin, daß die stark gesundheitsschädigenden Lösungsmittel Phenol und Chloroform verwendet werden müssen.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Aufgabe war somit die Bereitstellung eines Verfahrens, mit dem Nukleinsäuren in biologischen Materialien gegen Abbau stabilisiert und bei dem die enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren hemmende Substanzen abgetrennt werden können. Insbesondere soll ein Verfahren bereitgestellt werden, das eine zuverlässige Isolierung von Nukleinsäuren aus fäkalen Proben ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe aus biologischen Materialien eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen zusetzt und anschließend die Nukleinsäuren gegebenenfalls von gebundenen Verunreinigungen abtrennt. Das Inkontaktbringen der Nukleinsäuren enthaltenden Probe mit der Adsorptionsmatrix kann direkt oder nach Aufnehmen der Probe in Flüssigkeit erfolgen.

- 3 -

Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann die Brauchbarkeit von aus biologischen Materialien isolierten Nukleinsäuren, besondere DNA, deutlich verbessert werden. Weiterhin werden durch den Zusatz der Adsorptionsmatrix sowohl Nukleinsäuren schädigende als auch die enzymatische Manipulation hemmende Substanzen weitgehend abgetrennt. Die durch das erfindungsgemäße Verfahren stabilisierten Nukleinsäuren können daher über längere Zeit gelagert werden. Darüber hinaus werden bei einer Amplifikation der durch Zusatz einer Adsorptionsmatrix behandelten Nukleinsäuren, z.B. durch PCR, reproduzierbare Ergebnisse erhalten. Diese Reproduzierbarkeit ist essentiell für die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse bei der Nukleinsäure-Analyse. Die hohe Qualität der durch das erfindungsgemäße Verfahren gereinigter Nukleinsäuren zeigt sich beispielsweise darin, daß sie direkt durch Sequenzierung oder Heteroduplexanalyse untersucht werden können. Eine Klonierung ist nicht notwendig. Außerdem müssen beim erfindungsgemäßen Verfahren keine gesundheitsschädigenden Lösungsmittel eingesetzt werden.

Die beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Adsorptionsmatrix ist derart beschaffen, daß sie Verunreinigungen, die zur Schädigung von Nukleinsäuren führen oder/und die Durchführung enzymatischer Reaktionen verhindern oder/und enzymatische Reaktionen hemmen, wie etwa Abbauprodukte von Hämoglobin, z.B. Bilirubin und dessen Abbauprodukte, oder/und Gallensäuren oder Salze davon oder deren Abbauprodukte sowie andere Abbauprodukte pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, binden kann. Vorzugsweise verwendet man eine unlösliche Adsorptionsmatrix, da in diesem Fall eine leichtere Abtrennung von der Probe möglich ist.

Gute Ergebnisse werden mit einer Adsorptionsmatrix auf Basis von Kohlenhydraten oder/und Polypeptiden erhalten. Bevorzugt ist eine Adsorptionsmatrix auf Basis von Kohlenhydraten, z.B. eine Adsorptionsmatrix, die Polysaccharide enthält. Besonders bevorzugt verwendet man eine Adsorptionsmatrix, die  $\alpha$ - oder/und  $\beta$ -glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate enthält, z.B. Stärke,

Cellulose, Glykogen oder/und andere biogene oder nichtbiogene Kohlenhydrate sowie Derivate oder Mischungen davon.

Am meisten bevorzugt ist die Verwendung von Mehlen, d.h. im wesentlichen einer Mischung von Cellulose, Stärke, Lipiden und Salzen oder Bestandteilen daraus. Als geeignet haben sich beispielsweise Mehle aus Getreide, Mais, Erbsen, Soja und Kartoffeln oder Bestandteile daraus bzw. Mischungen davon, erwiesen. Für einen Fachmann ist es selbstverständlich, daß neben den genannten Mehlsorten auch andere Mehlsorten bzw. Mischungen von mehreren Mehlsorten oder Bestandteilen daraus eingesetzt werden können. Am meisten bevorzugt ist die Verwendung von Kartoffelmehl oder Bestandteilen daraus. Ebenso bevorzugt sind Mischungen aus gereinigten Kohlenhydraten, z.B. Cellulose, und Mehlen, z.B. Kartoffelmehl.

Weiterhin bevorzugt ist die Verwendung einer Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis zusammen mit löslichen Bestandteilen aus Mehlen, insbesondere aus einer oder mehreren der obengenannten Mehlsorten.

Die Menge, in der die Adsorptionsmatrix der biologischen Probe zugesetzt wird, hängt im wesentlichen von der Beschaffenheit der Probe, d.h. der Menge an Verunreinigungen, ab. Gute Ergebnisse wurden erhalten, wenn man die Adsorptionsmatrix in einem Gewichtsanteil von 0,05:1 bis 100:1 bezüglich der Nukleinsäuren enthaltenden Probe verwendet. Besonders bevorzugt wird die Adsorptionsmatrix in einer Menge von 0,1:1 bis 10:1 zugesetzt.

Die Nukleinsäuren enthaltende Probe, die durch das erfindungsgemäße Verfahren stabilisiert werden soll, stammt aus biologischen Materialien, die Nukleinsäuren—abbauende bzw. enzymatische Reaktionen hemmende Verunreinigungen enthalten. Vorzugsweise stammt die Nukleinsäuren enthaltende Probe aus Fäkalien.
Sie kann jedoch auch beispielsweise aus anderen Quellen, z.B.
Geweben jeder Art, Knochenmark, humanen und tierischen Körper-

- 5 -

flüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Urin, Sperma, Cerebrospinalflüssigkeit, Sputum und Abstrichen, Pflanzen, Pflanzenteilen und -extrakten, z.B. -säften, Pilzen, Mikroorganismen wie Bakterien, fossilen oder mumifizierten Proben, Bodenproben, Klärschlamm, Abwässern und Lebensmitteln stammen. Als Verunreinigungen können beispielsweise Abbauprodukte von Hämoglobin, wie etwa Bilirubin und dessen Abbauprodukte, oder/und Gallensäuren oder Salze davon oder deren Abbauprodukte, aber auch andere Arten von Verunreinigungen enthalten sein.

Zur besseren Handhabung des Verfahrens hat es sich als günstig erwiesen, die Probe aus biologischen Materialien vor dem Zusatz der Adsorptionsmatrix in einer Pufferlösung aufzunehmen. Die Inkubation der Probe mit der Adsorptionsmatrix kann bei Raumtemperatur erfolgen. Die Inkubationsdauer kann in weiten Bereichen variiert werden. Nach der Inkubation kann die Adsorptionsmatrix z.B. durch Zentrifugation von der Probe abgetrennt werden. Alternativ kann die Probe direkt mit der Adsorptionsmatrix versetzt werden, z.B. bei flüssigen biologischen Proben. Weiterhin kann die Probe über eine Adsorptionsmatrix durch Zentrifugation, durch Anlegen eines Vakuums oder/und mittels der Schwerkraft geführt werden, wobei die Adsorptionsmatrix vorzugsweise dann abgefüllt in einer Säule vorliegt.

Die Behandlung mit der Adsorptionsmatrix führt zu einer signifikanten Stabilitätserhöhung der in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren und bei einer anschließenden Isolierung der Nukleinsäuren zu einer besseren Reproduzierbarkeit. Dies gilt insbesondere, wenn sich an die Isolierung eine enzymatische Manipulation der Nukleinsäuren, z.B. eine Amplifikation oder/und eine Restriktionsspaltung anschließt. Besonders bevorzugt wird die Amplifikation, z.B. durch PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR (Ligase Chain Reaction), NASBA (Nucleic Acid Base Specific Amplification) oder 3SR (Self Sustained Sequence Replication) durchgeführt.

Ein besonders bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Analyse, der Nachweis oder die Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere DNA, aus Stuhlproben. Durch das erfindungsgemäße Verfahren sind saubere und amplifizierbare Nukleinsäuren aus fäkalen Proben erhältlich, die zum Nachweis von Mutationen, insbesondere von tumorspezifischen DNA-Mutationen verwendet werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt große Bedeutung für die Tumordiagnostik, da es den spezifischen Nachweis nukleärer eukaryotischer Nukleinsäuren in Gegenwart von Verunreinigungen und großer Mengen an bakteriellen Nukleinsäuren ermöglicht.

Durch Analyse von Stuhl-DNA unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens können Tumoren des Verdauungstrakts, insbesondere Pankreas- oder Darmtumoren, früher und genauer diagnostiziert werden. Diese Diagnose erfolgt beispielsweise durch Untersuchung von Onkogenen oder/und Tumorsuppressorgenen auf tumorspezifische DNA-Mutationen. Da Zellen von Tumoren des Verdauungstraktes laufend in den Stuhl abgeschilfert werden, ist eine Detektion von tumorspezifischen DNA-Mutationen im Stuhl durch das erfindungsgemäße Verfahren möglich. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt außerdem das Monitoring von Therapien, die im Hinblick auf die Eliminierung eines Tumors eingeschlagen wurden, sowie die regelmäßige und verläßliche Durchführung von Tumorpräventionsuntersuchungen.

Im Gegensatz zum einzigen, aus dem Stand der Technik bekannten nicht-invasiven Routinetest auf kolorektale Tumoren, dem Test auf okkultes Blut im Stuhl, kommt es beim erfindungsgemäßen Verfahren nicht bzw. nur sehr selten zu falsch-positiven Ergebnissen. Darüber hinaus ermöglicht der Nachweis von Mutationen in Genen, die schon im Adenomstadium, d.h. in einem sehr frühen Stadium der Tumorprogression mutieren, eine deutlich frühere und spezifischere Diagnose als der Stuhl-Bluttest. Als geeignete Objekte der Mutationsanalysen können insbesondere das Tumorsupressorgen APC (Adenomatöse Polyposis

- 7 -

Coli) (Fearon und Vogelstein (1990), Cell 61, 759-761) und das ras-Onkogen verwendet werden. Durch Mutationsanalysen dieser beiden Gene in DNA aus Stuhlproben können insbesondere Darmtumoren, z.B. Dickdarmtumoren, und Pankreastumoren erfaßt werden. Neben dem APC-Gen und dem ras-Gen können natürlich auch weitere tumorrelevante Gene für die Krebsdiagnose als Analyseobjekte dienen.

Abgesehen von tumorrelevanten Genen können auch nichttranslatierte repetitive Abschnitte des Genoms als Analyseobjekte in der Krebsdiagnose dienen. Diese sogenannten Mikrosatellitenabschnitte werden amplifiziert und das gelelektrophoretisch erhaltene Bandenmuster mit dem Bandenmuster von DNA aus
gesundem Körpermaterial desselben Patienten verglichen.
Unterschiedliche Bandenmuster können Hinweise auf das Vorhandensein eines Tumors liefern.

Ein weiteres Beispiel für die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine genaue Identifikation von Personen durch Untersuchung der aus Fäkalien oder Körpermaterial gereinigten Nukleinsäuren in der forensischen Analyse. Dazu werden repetitive polymorphe Abschnitte des Genoms amplifiziert und die Amplifikationsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch einen Vergleich der erhaltenen Bandenmuster mit den Mustern von DNA anderer verdächtiger oder eng verwandter Personen kann dann die betreffende Person identifiziert werden.

Eine weitere wichtige Anwendung für die erfindungsgemäße Isolierung von DNA aus fäkalen Proben sind zoobiologische populationsgenetische, evolutionsgenetische und botanische Studien und Untersuchungen von Tieren und Pflanzen. Bisher scheitern derartige Untersuchungen sehr häufig an der Seltenheit einer Tierart und der geringen Wahrscheinlichkeit, die betreffenden Tiere an einem bestimmten Ort anzutreffen. Bei Kenntnis des ungefähren Aufenthaltsortes kann eine Analyse von zurückgelassenen Fäkalien durch das erfindungsgemäße Verfahren wichtige Hinweise auf den Verwandtschaftsgrad der Tiere, auf

zurückgelegte Wanderungswege oder auf die Nahrungsgewohnheiten der Tiere liefern. Ebenso können aus der Analyse fäkaler Nukleinsäuren, z.B. durch Nachweis mikrobieller oder viraler Nukleinsäuren, wichtige diagnostische Informationen über Infektionen, z.B. bakterieller oder viraler Art abgeleitet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reagenzienkit zur Stabilisierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, umfassend:

- (a) einen zur Aufnahme einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe geeigneten Puffer und
- (b) eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen aus den biologischen Materialien.

Die Adsorptionsmatrix kann in einer abgepackten portionierten Form, z.B. abgefüllt in einer Säule wie etwa einer zentrifugierbaren Minisäule, vorliegen.

Vorzugsweise enthält das Reagenzienkit zusätzliche Mittel zur Reinigung von Nukleinsäuren, die z.B. mineralische oder/und organische Träger sowie gegebenenfalls Lösungen, Hilfsstoffe oder/und Zubehör umfassen. Mineralische Bestandteile von Trägern können beispielsweise poröse oder nicht-poröse Metalloxide oder Metallmischoxide, z.B. Aluminiumoxid, Titandioxid oder Zirkoniumdioxid, Silicagele, Materialien auf Basis von Gläsern, z.B. modifizierte oder nicht-modifizierte Glaspartikel oder Glasmehl, Quarz, Zeolithe oder Mischungen von einer oder mehrerer der obengenannten Substanzen sein. Andererseits kann der Träger auch organische Bestandteile enthalten, die z.B. aus gegebenenfalls mit funktionellen Gruppen modifizierten Latexpartikeln, synthetischen Polymeren, wie etwa Polyethylen, Polypropylen, Polyvinylidenfluorid, insbesondere ultrahochmolekularem Polyethylen oder HD-Polyethylen, oder Mischungen

- 9 -

von einer oder mehreren der zuvor genannten Substanzen ausgewählt werden.

Der Träger kann beispielsweise in Form von Partikeln mit einer mittleren Größe von 0,1  $\mu$ m bis 1000  $\mu$ m vorliegen. Bei Verwendung eines porösen Trägers ist eine mittlere Porengröße von 2  $\mu$ m bis 1000  $\mu$ m bevorzugt. Der Träger kann beispielsweise in Form loser Schüttungen von Partikeln, Filterschichten, z.B. aus Glas, Quarz oder Keramik, Membranen, z.B. Membranen, in denen ein Silicagel angeordnet ist, Fasern oder Geweben aus mineralischen Trägern, wie etwa Quarz oder Glaswolle sowie in Form von Latices oder Frittenmaterialien aus synthetischen Polymeren vorliegen.

Weiterhin kann das Reagenzienkit auch noch geeignete Lösungen, z.B. Waschlösungen oder Pufferlösungen zur Aufnahme der Probe enthalten. Ein zur Aufnahme einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe geeigneter Puffer ist beispielsweise ein Puffersystem auf Basis von Tris-HCl pH 8,5-9,5, EDTA und gegebenenfalls NaCl. Ein besonders bevorzugter Puffer, insbesondere zur Aufnahme von Stuhlproben, enthält 500 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM EDTA und 10 mM NaCl.

Außerdem kann das erfindungsgemäße Reagenzienkit auch Hilfsstoffe wie Enzyme und andere Mittel zur Manipulation von Nukleinsäuren enthalten, z.B. mindestens einen Amplifikationsprimer und zur Amplifikation von Nukleinsäuren geeignete Enzyme, z.B. eine Nukleinsäurepolymerase oder/und mindestens eine Restriktionsendonuklease.

Die Primer zur Amplifikation von Nukleinsäuren stammen zweckmäßigerweise aus den zu analysierenden Genen, d.h. beispielsweise aus Onkogenen, Tumorsupressorgenen oder/und Mikrosatelliten-abschnitten. Zur Amplifikation von Nukleinsäuren geeignete Enzyme und Restriktionsendonukleasen sind bekannt und kommerziell erhältlich.

Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch das nachfolgende Beispiel erläutert werden.

### Beispiel 1

Analyse von DNA aus Stuhlproben

Es wurden folgende Adsorptionsmatrizen getestet: Immobilisiertes Rinderserum-Albumin (RSA), Cellulose und Kartoffelstärke (alle von Sigma, München, DE) und Kartoffelmehl (Honig, Postbus 45, 1540 AA Koog a/d Zaan, NL), bei dem es sich im wesentlichen um eine unlösliche Mischung aus Cellulose, Stärke, Lipiden und Salzen handelt.

Menschliche Stuhlproben wurden gesammelt, eingefroren und bei - 80°C aufbewahrt. 200 mg Stuhl wurden in 600  $\mu$ l Stuhl-Lösepuffer (SLP: 500 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM EDTA, 10 mM NaCl) homogenisiert. Zu jeweils 1/4 des Homogenats wurden 200  $\mu$ l SLP mit 100 mg der jeweiligen Adsorptionsmatrix gegeben. Die Mischung wurde heftig vermischt und zweimal bei 500 x g bzw. 13000 x g für jeweils 5 min zur Präzipitation von Bakterien und anderen Verunreinigungen zentrifugiert. Nach Behandlung des klaren Überstands mit Proteinase K in einer Konzentration von 2,5 mg/ml wurde die DNA unter Verwendung einer DNA-Spinsäule (Qiagen, Hilden, DE) gereinigt, die zur DNA-Reinigung aus Blut und Gewebe geeignet ist. Die Säulenbeladung und Waschschritte wurden wie vom Hersteller angegeben, durchgeführt.

Die DNA wurde dann aus der Spinsäule in einem Endvolumen von  $150~\mu l$  destillierten Wasser eluiert und bis zur Verwendung bei -  $20\,^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Ausbeute an chromosomaler DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

Alle Präparationen zeigten vergleichbare Gesamt-DNA-Mengen von  $15\text{--}20~\mu\text{g}$ . Auf einem analytischen Agarosegel waren keine Unterschiede zwischen der genomischen DNA aus Präparationen mit und ohne Adsorptionsmatrix zu erkennen. Durch Zugabe der

- 11 -

Adsorptionsmatrix wurde auch keine Erhöhung in der Ausbeute der xtrahierten chromosomalen DNA festgestellt.

Zum Test der Stabilität der isolierten Nukleinsäuren wurde die DNA nach einwöchiger Aufbewahrung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt. Die stabilsten DNA-Proben wurden nach Verwendung von Kartoffelmehl als Adsorptionsmatrix erhalten.

Für die Amplifizierung durch PCR wurden 3  $\mu$ l der gereinigten chromosomalen DNA in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l verwendet, das 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM/MgCl<sub>2</sub>, 30  $\mu$ M jeweils dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 400 nM jedes Primers, 100  $\mu$ g/ml RSA und 0,75 Einheiten Taq-Polymerase (AGS, Heidelberg, DE) enthielt.

Zur Sensitivitätsbesserung wurden Nested-PCR-Methoden (vgl. Jackson et al., (1991), in McPherson, N.J. Quirke, P. Taylor, G.R. (Hrsg.), PCR-A Practical Approach, Oxford University Press) unter Verwendung von Biotin-markierten Nested-Primern durchgeführt. Eine PCR von in Abwesenheit einer Adsorptionsmatrix gereinigten DNA-Proben war vollständig blockiert. Durch Zusatz von RSA, Cellulose oder Kartoffelstärke als Adsorptionsmatrix konnten teilweise reproduzierbare PCR-Ergebnisse erhalten werden (Tabelle 1).

Reproduzierbare PCR-Ergebnisse in allen zehn analysierten Proben wurden bei Verwendung von Kartoffelmehl als Adsorptionsmatrix erhalten. Die PCR-Fragmente waren zur Verwendung bei der Heteroduplexanalyse und auch zur direkten Sequenzierung geeignet. Hierzu erfolgte eine Präparation von einzelsträngiger DNA unter Verwendung von Streptavidin-gekoppelten Magnetbeads (Dynal, Hamburg, DE) gemäß den Angaben des Herstellers.

- 12 -

TABELLE 1: Eigenschaften von nukleärer DNA aus Stuhl

Matrix	Verlust*	PCRb	·
-	80 %	0	
RSA	60 %	3	
Cellulose	60 %	4	
Kartoffelstärke	60 %	4	
Kartoffelmehl	< 5 %	10	

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Der DNA-Verlust durch Abbau wurde nach Aufbewahrung für 1 Woche bei - 20°C durch analytische Agarosegelelektrophorese und spektrophotometrische Analyse gemessen.

### Beispiel 2

Reinigung von Stuhlproben

#### Verwendete Puffer:

Puffer SLP: (siehe Beispiel 1)

Puffer A: 5,6 M Guanidinium/HCl; 20% Tween 20

Puffer B: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 70% Ethanol

Puffer C: 10 mM Tris/HCl pH 9,0; 0,5 mM EDTA

Von einer gefrorenen Stuhlprobe wurden 3 g eingewogen und mit 2 ml Puffer SLP durch gründliches Vortexen gemischt. Anschließend wurde eine Säule mit einer 1:1 Mischung (w/w) aus Kartoffelmehl und Cellulose gefüllt und in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gesteckt. Die in Puffer aufgenommene Probe wurde

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Es wurde eine PCR von DNA aus zehn verschiedenen Stuhlproben durchgeführt. Es ist die Anzahl von Proben angegeben, die durch PCR analysierbar waren.

- 13 -

in diese Säule überführt und durch Zentrifugation bei 500 Upm für 5 Min von Verunreinigungen geklärt.

Zu 1,2 ml geklärter Probe wurden 0,125 ml Proteinase K-Stammlösung (1,785 mg/ml) und 1,2 ml Puffer A gegeben. Die Probe wurde durch Vortexen für 1 Min gemischt und anschließend für 10 Min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,3 ml absolutem Alkohol und gründlichem Mischen wurde die Lösung in eine Qia-AMP-Midisäule (Qiagen) transferiert und die Nukleinsäuren durch Zentrifugation auf einer Silikamatrix gebunden.

Die gebundenen Nukleinsäuren wurden durch zweimaliges Waschen mit 2,5 ml Puffer B gereinigt und mit 0,5 ml Puffer C von der Qia-AMP-Midisäule eluiert und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Bei einer wie in Beispiel 1 durchgeführten PCR an den gelagerten Proben konnten reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

#### Patentansprüche

- Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, dadurch gekennzeichnet,
   daß man einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe aus biologischen Materialien eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen zusetzt.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis verwendet.
- 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Adsorptionsmatrix verwendet, die  $\alpha$  oder/ und  $\beta$ -glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate enthält.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3. dadurch gekennzeichnet, daß man eine Adsorptionsmatrix verwendet, die Stärke, Cellulose, Glykogen oder/und andere biogene oder nichtbiogene Kohlenhydrate oder Mischungen davon enthält.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Adsorptionsmatrix ein Mehl aus Getreide, Erbsen, Mais, Soja, Kartoffeln oder Bestandteile daraus oder Mischungen davon verwendet.
- 6. Verfahren nach Anspruch 5,
  dadurch gekennzeichnet,
  daß man Kartoffelmehl oder Bestandteile daraus verwendet.

- 15 -

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis zusammen mit löslichen Bestandteilen aus Mehlen verwendet.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Adsorptionsmatrix Mischungen aus gereinigten
Kohlenhydraten oder/und Mehlen verwendet.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Adsorptionsmatrix Mischungen aus Cellulose und Kartoffelmehl verwendet.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Adsorptionsmatrix in einem Gewichtsanteil von 0,05 : 1 bis 100 : 1 bezüglich der Nukleinsäuren enthaltenden Probe zusetzt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nukleinsäuren enthaltende Probe aus menschlichen
oder tierischen Geweben, Knochenmark, Körperflüssigkeiten,
Pflanzen, Pflanzenteilen und -extrakten, Pilzen, Mikroorganismen, fossilen oder mumifizierten Proben, Bodenproben,
Klärschlamm, Abwässern, Fäkalien und Lebensmitteln stammt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nukleinsäuren enthaltende Probe als Verunreinigungen Substanzen mit Nukleinsäuren schädigender
oder/und enzymatische Reaktionen hemmender Wirkung
enthält.

- 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren enthaltende Probe als Verunreinigungen Abbauprodukte von Hämoglobin oder/und Gallensäuren oder Salze davon oder/und Abbauprodukte pflanzlichen oder tierischen Ursprungs enthält.
- 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, daß man die Probe aus biologischen Materialien vor dem Zusatz der Adsorptionsmatrix in einer Pufferlösung aufnimmt.
- 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß man die Probe aus biologischen Materialien direkt mit der Adsorptionsmatrix versetzt.
- 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, daß man die Probe durch Zentrifugation, durch Anlegen eines Vakuums oder/und mittels der Schwerkraft über die Adsorptionsmatrix führt.
- 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß sich an die Isolierung der Nukleinsäuren deren direkte Analyse anschließt.
- 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-17, dadurch gekennzeichnet, daß sich an die Isolierung eine enzymatische Manipulation der Nukleinsäuren anschließt.
- Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet,

- 17 -

daß die enzymatische Manipulation eine Amplifikation oder/und eine Restriktionsspaltung umfaßt.

20. Verfahren nach Anspruch 19,

#### dadurch gekennzeichnet,

daß die Amplifikation durch PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR (Ligase Chain Reaction), NASBA (Nucleic Acid Base Specific Amplification) oder 3SR (Self Sustained Sequence Replication) erfolgt.

- 21. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1-20 zur Analyse, zum Nachweis oder zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Stuhlproben.
- 22. Verwendung nach Anspruch 21 zum Nachweis von DNA-Mutationen.
- 23. Verwendung nach Anspruch 21 oder 22 zur Analyse, zum Nachweis oder zur Isolierung nukleärer eukaryontischer Nukleinsäuren.
- 24. Verwendung nach Anspruch 23 zur Diagnostik von Tumoren des Verdauungstrakts, insbesondere von Pankreas- oder Darmtumoren.
- 26. Verwendung nach Anspruch 23 zur Untersuchung von Tieren und Pflanzen.
- 27. Verwendung nach Anspruch 21 zum Nachweis mikrobieller oder viraler Nukleinsäuren.

34.

gen davon enthält.

- Verwendung nach Anspruch 27 zur Diagnostik bakterieller 28. und viraler Infektionen.
- Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1-20 29. zum Verwandtschaftsnachweis und zur forensischen Identifikation von individuellen Personen.
- 30. Reagenzienkit zur Reinigung und Stabilisierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, umfassend:
  - einen zur Aufnahme einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe geeigneten Puffer und
  - (b) eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen aus den biologischen Materialien.
- 31. Reagenzienkit nach Anspruch 30, zusätzlich umfassend Mittel zur weiteren Reinigung von Nukleinsäuren.
- 32. Reagenzienkit nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur weiteren Reinigung von Nukleinsäuren mineralische oder/und organische Träger sowie gegebenenfalls Lösungen, Hilfsstoffe oder/und Zubehör umfassen.
- 33. Reagenzienkit nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger mineralische Bestandteile aus porösen oder nichtporösen Metalloxiden oder Metallmischoxiden, Silicagelen, Materialien auf Basis von Gläsern oder Quarz, Zeolithen oder Mischungen davon enthält.
- Reagenzienkit nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger organische Bestandteile aus gegebenenfalls modifiziertem Latex, synthetischen Polymeren oder Mischun-

- 19 -

- Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 32-34,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß der Träger in Form von Partikeln mit einer mittleren
   Größe von 0,1 μm bis 1000 μm vorliegt.
- 36. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 32-35, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger Poren mit einer mittleren Größe von 2  $\mu$ m bis 1000  $\mu$ m aufweist
- 37. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 32-36,
  dadurch gekennzeichnet,
  daß der Träger in Form loser Schüttungen von Partikeln,
  Filterschichten, Membranen, Geweben, Fasern oder Fritten
  vorliegt.
- 38. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 30-37, dadurch gekennzeichnet, daß die Adsorptionsmatrix in einer Säule abgefüllt ist.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No PCT/EP 96/03595

		PCT/E	EP 96/03595
A. CLASSI	IFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68	•	
	to International Patent Classification (IPC) or to both national classic	lication and IPC	·
	s SEARCHED tocumentation searched (classification system followed by classificat	ion symbols)	
IPC 6	C12Q		
Documenta	tion searched other than minimum documentation to the extent that	such documents are included in the	e fields searched
Electronic d	data base consulted during the international search (name of data base	e and, where practical, search term	ns used)
C BOOTIS	ACART CONTINUED TO BE BELEVANT		
Category *	AENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Citation of document, with indication, where appropriate, of the re	elevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,O 393 744 (EASTMAN KODAK CO) October 1990 see the whole document	24	1-31
X	EP,A,O 389 063 (AKZO NV) 26 Septe see the whole document	ember 1990	30-38
A	EP,A,O 574 267 (GEN PROBE INC) 1993	5 December	1-38
	see page 4, line 15-20		
A	EP,A,O 189 280 (DEKALB PFIZER GEI July 1986 see page 3, line 25-36	NETICS) 30	1-9
	see page 3, Time 23-30		
		-/	
X Fur	ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members a	re listed in annex.
•	ategories of cited documents :  nent defining the general state of the art which is not		onflict with the application but
consid E° earlier	dered to be of particular relevance · document but published on or after the international	invention "X" document of particular relevant	niple or theory underlying the
	date  the control of	cannot be considered novel	or cannot be considered to en the document is taken alone
citatio	on or other special reason (as specified) nent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means	cannot be considered to invo document is combined with	ance, the diameter step when the one or more other such docu- ing obvious to a person skilled
	nent published prior to the international filing date but than the priority date claimed—	in the art.  "&" document member of the sar	ne patent family
Date of the	e actual completion of the international search	Date of mailing of the intern	stional search report
3	31 October 1996	19	. 11. 96
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2	Authorized officer	
	NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Hagenmaier,	S

. 1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No PCT/EP 96/03595

C (Cambina	No. DOCTIMENTS CONSIDERED TO THE	PCT/EP 96/03595
Category *	ction) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 20235 (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOO) 14 October 1993 cited in the application see the whole document	1-38
P,X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 23, no. 18, 25 September 1995, pages 3800-3801, XP002017414 DEUTER ET AL.: "A METHOD FOR PREPARATION OF FECAL DNA SUITABLE FOR PCR" see the whole document	1-38
		·
200	.0 (continuation of second sheet) (July 1992)	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

unformation on patent family members

Intern al Application No PCT/EP 96/03595

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
EP-A-0393744	24-10-90	US-A-	5334499	02-08-94	
2 00507	4. 4. 2.	AT-T-	117377	15-02-95	
		CA-A-	2013316	17-10-90	
		DE-D-	69016079	02-03-95	
		DE-T-	69016079	14-09-95	
		EP-A-	0620282	19-10-94	
		JP-A-	2292298	<b>03-12-90</b>	
		JP-B-	7002120	18-01-95	
EP-A-0389063	26-09-90	NL-A-	8900725	16-10-90	
		AU-B-	641641	30-09-93	
		AU-A-	5215390	27-09-90	
		CA-A-	2012777	23-09-90	
		DE-T-	389063	10-10-96	
		ES-T-	2085245	01-06-96	
		JP-A-	2289596	29-11-90	
		US-A-	5234809	10-08-93	
EP-A-0574267	15-12-93	AU-B-	668746	16-05-96	
		AU-A-	4535593	04-01-94	
		CA-A-	2137690	23-12-93	
		JP-T-	8501208	13-02-96	
		WO-A-	9325711	23-12-93	
EP-A-0189280	39-07-86	JP-A-	61234799	20-10-86	
WO-A-9320235	14-10-93	CA-A-	2132874	14-10-93	
		EP-A-	0672181	20-09-95	
-		JP-T-	8504081	07-05-96	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. ales Aktenzeichen
PCT/FP 96/03595

	·	PU1/	EP 90/03090
A. KLASS IPK 6	ifizierung des anmeldungsgegenstandes C12Q1/68		
Nach der In	nternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen K	lassifikation und der IPK	
B. RECHE	RCHIERTE GEBIETE		
Recherchier IPK 6	ter Mindestprüßtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymb C12Q	ole)	
Recherchier	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, s	oweit diese unter die recherchierte	n Gebiete fallen
Während de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (N	lame der Datenbank und evd. ve	erwendete Suchbegriffe)
C. ALS W	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angal	oe der in Betracht kommenden Te	tile Betr. Anspruch Nr.
х	EP,A,O 393 744 (EASTMAN KODAK CO) 24.Oktober 1990 siehe das ganze Dokument		1-31
х	EP,A,O 389 063 (AKZO NV) 26.Septe siehe das ganze Dokument	ember 1990	30-38
A	EP,A,O 574 267 (GEN PROBE INC) 15 1993 siehe Seite 4, Zeile 15-20	5.Dezember	1-38
A	EP,A,O 189 280 (DEKALB PFIZER GEN 30.Juli 1986 siehe Seite 3, Zeile 25-36	HETICS)	1-9
		·/	
	· .		
	tere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang Patentfam	uilie
'A' Veröffi aber n 'E' älteres	entlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, sicht als besonders bedeutsam anzusehen ist. Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen	oder dem Prioritätsdatum von Anmeldung nicht kollidiert, s Erfindung zugrundeliegenden Theorie angegeben ist	nach dem internationalen Anmeldedatum röffentlicht worden ist und mit der sondern nur zum Verständnis des der I Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden erer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung
schein andere	entlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- en zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer en im Recherchenbenicht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	kann allein aufgrund dieser v erfindenischer Tätigkeit beruh 'Y' Veröffentlichung von besond kann nicht als auf erfinderisc	Veröffentlichung nicht als neu oder auf vend betrachtet werden erer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung her Tätigkeit beruhend betrachtet
'O' Veröff eine B 'P' Veröff	entlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, lenutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht entlichung, die werden internationalen Ausstelden und der Ausstellung und der	Veröffentlichungen dieser Kadiese Vertsindung für einen F  *& Veröffentlichung, die Mitglie	
Datum des	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internatio	nalen Recherchenberichts
3	1.0ktober 1996	1	9. 11. 96
Name und	Postanschrist der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk	Bevollmächtigter Bedienstete	r
1	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx, 31 651 epo nl,	Hagenmaier.	<

· 1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern ales Aktenzeichen
PCT/EP 96/03595

		T/EP 96	6/03595
	ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden	Tale	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,93 20235 (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOO) 14.Oktober 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument		1-38
P,X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 23, Nr. 18, 25.September 1995, Seiten 3800-3801, XP002017414 DEUTER ET AL.: "A METHOD FOR PREPARATION OF FECAL DNA SUITABLE FOR PCR" siehe das ganze Dokument		1-38
	·		
			· ·
		•	
		:	
		-	
	·		

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentsamilie gehören

Intern ales Aktenzeichen
PCT/EP 96/03595

Im Recherchenbericht geführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied Patent	l(er) der familie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0393744	24-10-90	US-A-	5334499	02-08-94
EI - M. 00307 44	L4 10 70	AT-T-	117377	15-02-95
		CA-A-	2013316	17-10-90
		DE-D-	69016079	02-03-95
		DE-T-	69016079	14-09-95
		EP-A-	0620282	19-10-94
		JP-A-	2292298	03-12-90
•		JP-B-	7002120	18-01-95
EP-A-0389063	26-09-90	NL-A-	8900725	16-10-90
		AU-B-	641641	30-09-93
		AU-A-	5215390	27-09-90
		CA-A-	2012777	23-09-90
		DE-T-	389063	10-10-96
		ES-T-	2085245	01-06-96
		JP-A-	2289596	29-11-90
		US-A-	5234809	10-08-93
EP-A-0574267	15-12-93	AU-B-	668746	16-05-96
		AU-A-	4535593	04-01-94
		CA-A-	2137690	23-12-93
		JP-T-	8501208	13-02-96
		WO-A-	9325711	23-12-93
EP-A-0189280	30-07-86	JP-A-	61234799	20-10-86
WO-A-9320235	14-10-93	CA-A-	2132874	14-10-93
, , , , , , , , , , , , , , , ,	•, ••	EP-A-	0672181	20-09-95
		JP-T-	8504081	07-05-96